

— 総 説 —

重症筋無力症と動物モデル

— 受容体と免疫の観点から —

金沢大学医学部附属病院神経内科

高 守 正 治

Key words Acetylcholine receptor protein, Monoclonal antibody, Anti-idiotypic antibody, Complement, Cytoskeletal protein

I. 結 言

神経筋シナプスの疾患である重症筋無力症は、骨格筋ニコチン性アセチルコリン受容体 (AChR) を標的とする自己免疫性受容体疾患とする考えが定着している。その解明に大きな役割を果たしてきたのが、AChR と特異的に結合する α -ブングアロトキシン (BuTX) で代表される蛇毒とともに、大量の AChR を含む魚類電気器官の存在という自然の恵みに支えられた動物モデル (Experimental autoimmune myasthenia gravis, EAMG) の作出と応用であった。その結果をふまえ、本病の発症機構は、抗 AChR 抗体を中心にすえ図 1 に示す 3 つの免疫機序によって説明されている。しかし、このように病因の主役として位置付けられた抗体も、近年生物工学的技術の導入によって全貌が明らかにされつつある AChR のサブユニット構成、cDNA 塩基配列から決定された各サブユニット蛋白の一次構造に対応して、その内容は単純でないことが明らかになってきた。抗原決定基を異にする抗体は多様であり、それぞれのシナプス伝達障害にかかわる作用機序は、明、不明を含み多彩である。モノクローナル抗体産生細胞株の樹立と応用は、これらの解析にも大きな貢献を果たしつつあり、また決定された AChR 前駆体一次構造に照合して合成されたペプチドを用いた研究の、本病解明に資する分野にも大きな進歩が遂げられつつある。動物モデルを駆使したこの面の研究の、歴史、現況、展望を以下に概説する。

II. 抗原—天然の受容体蛋白と動物モデル

まず動物実験の抗原として使用し、また病的免疫反応の標的となる AChR の構造と機能に関する情報が

必要となろう。本蛋白の抽出方法の基本は、魚類電気器官を界面活性剤で処理し、AChR と特異的結合性をもつトキシンとの親和性を保ったまま可溶化、コブラ毒のような可逆的結合性を持ったトキシンの用いた affinity chromatography で分離、コリン類似物質で溶出、精製して得るにある (図 2)。

このようにして得られた AChR は糖蛋白の 1 種で、シビレエイ (Torpedo) 電気器官由来の AChR の場合、5 ケのサブユニット $2\alpha, \beta, \gamma, \delta$ から成っており、分子量は SDS-PAGE から求めるとそれぞれ 38,000, 50,000, 57,000, 64,000 とされるが、cDNA 塩基配列から明らかにされたそれは 50,116, 53,681, 56,279, 57,565 である¹⁾ (図 3)。各サブユニットはイオンチャンネルを囲んで $\alpha\gamma\alpha\delta\beta$ と配列、2 つの α サブユニットとも類似のペプチドマップを持ち ACh 結合能を担う。トキシン (α -BuTX) に対する親和性では両者同様であるが、免疫学的な筋無力症抗体との親和性では異なる性質が証明されている²⁾。cDNA 塩基配列からシビレエイ各サブユニット蛋白の一次構造をみると、それぞれの間にはかなりの類似性があり³⁾、また魚類電気器官と哺乳動物骨格筋の AChR の間の類似性も大きい。特に α サブユニット間の類似性が高く、ヒトとシビレエイは約 80% とされ⁴⁾、このサブユニットの ACh 結合能を担う重要性和関係しているのかもしれない。2 ケの α サブユニット両者には、ACh 結合能はないものの native AChR の 50% 以上が抗原決定基とする main immunogenic region (MIR) と称される部位があり (図 3)、後述するように本病の成因に深い関わりのあるものとして注目されている⁵⁾。AChR の機能には ACh 結合能とともに重要な膜イオン透過性制御機構イオンチャンネル (イオノフォア) があり、各サブユニットのこれに関わる役割の程度には、差があるかどうか議論のあるところであるが、チャンネルの開閉時間決定には δ サブユニットが重要視されている

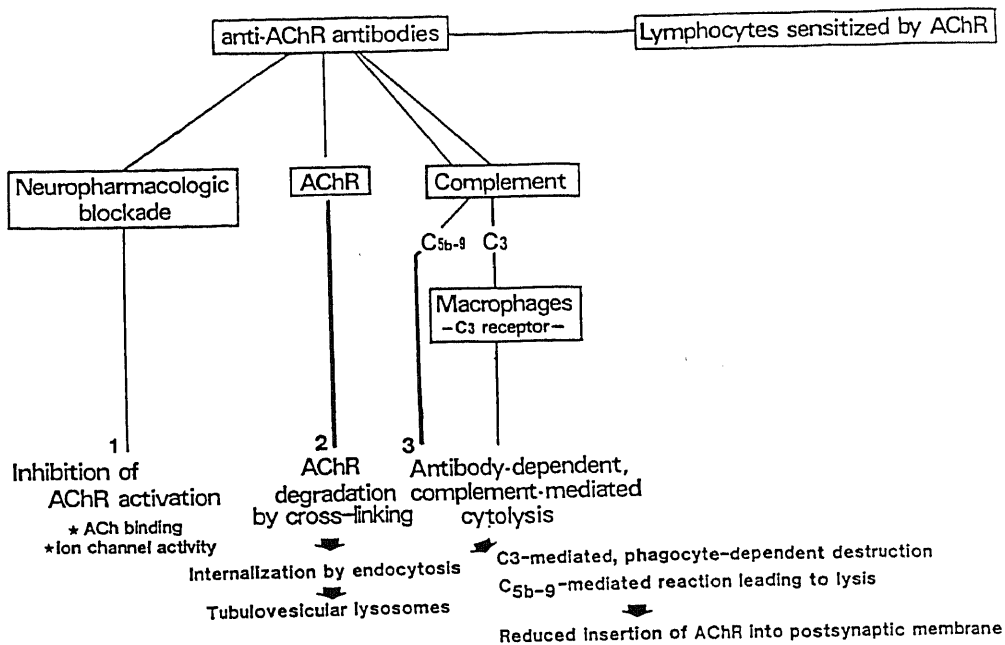


Fig. 1. Immunological mechanism based upon anti-acetylcholine receptor (AChR) antibody in the induction of myasthenia gravis.

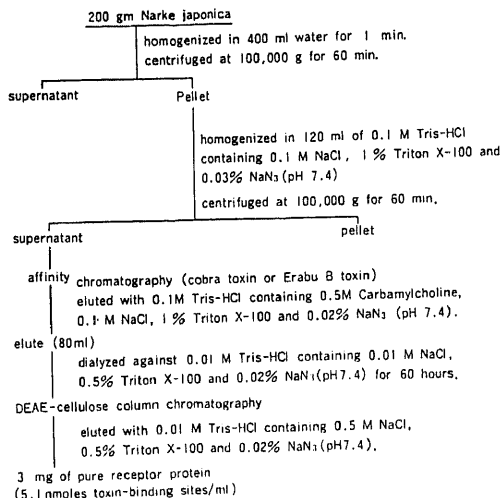


Fig. 2. Extraction and purification of AChR from the electric organ of *Narke japonica*.

る⁵⁾。

このようにして全貌が明らかにされた天然の AChR を魚類電気器官（わが国の場合 *Narke japonica* が採取容易）から抽出、精製、これを抗原として動物を免疫、発症の過程と解析の内容を、雌Lewis 系ラットを用いた場合を例にとり概説すると以下の

通りである。精製 *Narke* AChR (37 μ g) を等量の完全アジュバントとともに皮内注（添加アジュバントとして B. Pertussis vaccine 0.5×10^{10} 皮下注）とすると、9～11 日目（急性期 EAMG）と、一時軽快のあと約 28～36 日目以後（慢性期 EAMG）に筋無力症状の発現をみる。このラットから横隔膜神経筋標本作製、微小電極法による電気生理学的指標でみると、自発性微小終板電位 MEPP 振幅低下が唯一の有意所見で、急、慢性期の違いは程度の差にすぎず、定性的にはいずれもヒト筋無力症類似のものであった（表 1-1, 2）。しかし、神経筋接合部超微形態を観察すると、急性期はマクロファージ侵襲、終板膜破壊が主徴であり（図 4 A）、慢性期はシナプス間隙開大、嚢減少、終板膜単純化を示し（図 4 B）、これがヒト筋無力症に類似する。自己骨格筋 AChR に対する抗体価（抗ラット IgG を用いた 2 抗体免疫沈殿法で測定）および抗原に用いた *Narke* AChR で感作されたリンパ球（幼若化率を stimulation index で表現）の 2 免疫学的指標で観察すると、前者の指標は急性期に微増、慢性期に著増し、後者の指標は急、慢性期を通じて認められた（表 1-1, 2）。諸相を総合すれば、慢性期 EAMG が完全に近い動物モデルということが出来る、また、この EAMG 発症過程のうち、その急性期を免疫薬理学的に（prostaglandin E_1 使用）抑えても、慢性期像は成立しうる（表 1-4）⁶⁾ ので、マクロファージ侵襲の病期

は、ヒト類似の病態の成立に必ず先行すべきものではない。

以上の観察は、抗 AChR 抗体がヒト、動物モデルの両舞台に共通の主役であることを示唆し、ヒト抗 AChR 抗体によって動物への疾患移送が可能な事実とともに、ヒト筋無力症同様、動物モデルの運動終板膜にも抗体付着を証明できる (図 4 C) ことによって確実なものと思われる。しかし、既述したような AChR 構造の複雑さからも推察されるように、抗原決定基を異にする多様な抗体があり、一般臨床検査にも

用いられる 2 抗体免疫沈殿法による抗体価 (AChR の ACh 結合部以外の部位を認識する複数の抗体を総合表現, binding 抗体として評価される) は、慢性期ラット間では必ずしも重症度 (電気生理学的指標 MEPP 振幅低下度) と相関しない (図 5)。また、慢性期ラット血清を Narke AChR を用い Western blotting 法で調べる各サブユニット蛋白に対する複数の抗体が産生されていることがわかる (図 3)。また antigenic difference の観点から、抗体の性質はヒト、動物間で必ずしも同一でない。ヒト筋無力症抗体はラット骨格筋 junctional AChR よりも extrajunctional AChR (除神経筋) とつよく反応する一方、動物モデル (魚類電気器官またはラット骨格筋由来 AChR で免疫し発症したラット EAMG) の抗体は、両者と同程度に反応する⁷⁾。動物モデル自体のなかでも、精製 AChR を還元アルキル化し変性処理を加えたものをアジュバントとともにラットに注射すると、その後、非変性処理 AChR でこのラットを免疫しても、前述の 2 抗体免疫沈殿法で評価する抗体価は著増するにもかかわらず、EAMG 慢性期の発症をある程度抑えることができる (MEPP 振幅指標) (表 1-5)。抗変性 AChR 抗体は、変性処理、非処理両 AChR と免疫学的に交叉反応するので、この抗体が病原性抗体と競合する形で発症抑制的に働くものも推察され、これも抗体内容の複雑さを示唆する一事実と云えよう。

III. モノクローナル抗体による病像の作出

近年のモノクローナル抗体開発のめざましい進歩

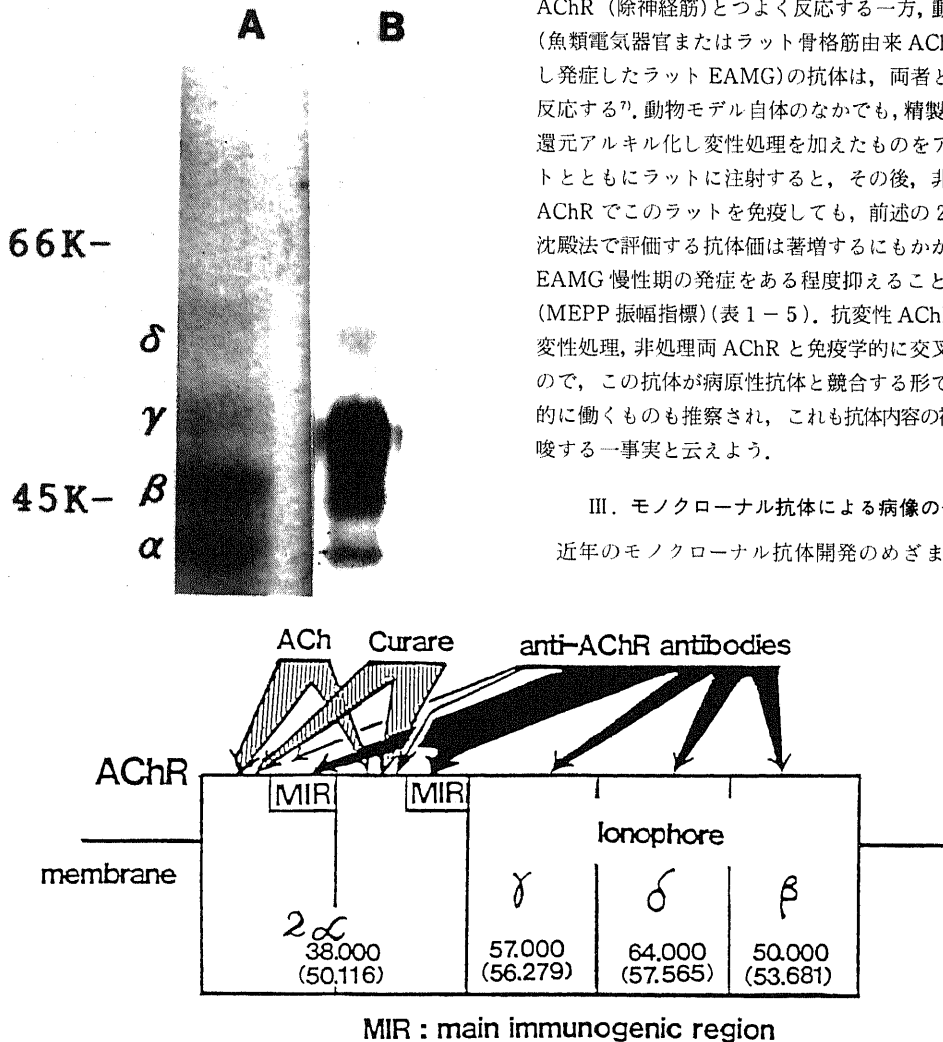


Fig. 3. Upper-SDS-PAGE of the AChR, demonstrating α , β , γ , and δ subunit proteins (A), and immunoblots incubated with rat anti-Narke AChR antiserum (B). Lower-Schematic drawing of the subunit constitution of AChR. Number in each compartment indicates molecular weight determined by SDS-PAGE (number in parenthesis, molecular weight based on cDNA). Arrows indicate targets of pharmacologic agents and anti-subunit antibodies.

は、一方では AChR 構造の解析に、他方では複雑な AChR 構造に対応する多様な抗体個々の作用機序、重症筋無力症病像成立に関わる役割分担の解明に新しい展望を開きつつあり、これらを駆使した *in vitro*, *in vivo* レベルでの動物モデル研究の貢献するところは大きい。モノクローナル抗体産生細胞株樹立法は、他の分野におけると同様で、AChR で感作したマウス・ラットのリンパ球とマウス骨髓腫細胞との hybridization による方法のほか、図 6 ではわれわれが行っているリンパ球のウイルス感染による形質転換細胞から得る方法を示している。以下に、抗体の主な病原性作用機序の観点から分類して略述する。

1. 受容体活性の直接阻害 (図 1 参照)

いわゆる blocking 抗体として (図 7), AChR の α サブユニットの ACh 結合部 (図 3 参照) を認識する抗体がこの作用を担っている。この種のモノクローナル抗体による動物への疾患移送実験で、Gomez & Richman⁹⁾ はハイブリドーマ産生抗体によって鶏に、われわれ¹⁰⁾ は EB ウイルス感染による形質転換細胞産生抗体によってラットに、運動終板膜形態に変化をもたらすことなく、ACh 結合機能を阻害する形で、筋無

力症を作出している (図 8)。

ACh 結合能と並んで受容体機能として重要なイオン・チャネル活性と筋無力症抗体との関係は、ヒト¹⁰⁾、動物モデル¹¹⁾ともこの異常はないものとされ、EAMG 血清の灌流実験でも同様の結果を得ている (図 7)¹²⁾。しかし、ハイブリドーマ産生抗体の中には、Na⁺ コンダクタンス阻害作用を担うモノクローナル抗体が見出されている¹³⁾。

2. 受容体崩壊促進 (図 1 参照)

補体を必要とせず 2 価の抗体の cross-linking で AChR 崩壊が促進される事実は、ヒト筋無力症 (図 9) 同様、ラット EAMG 由来の抗体を培養筋細胞に作用させることによって証明される¹⁴⁾。図 10 はヒト筋無力症抗体をマウス胸腔内に注入し、*in vivo* でも AChR (横隔膜筋) の崩壊が促されることを示している。モノクローナル抗体としては、 α サブユニットのなかの ACh 結合能を持たない部位 (既述の MIR, 図 3 参照) を標的とする抗体が、この作用に関わるとされる¹⁵⁾。前項の blocking 抗体に対して、この種の抗体は II 節で述べた binding 抗体に属する。この抗体によって引金がひかれた以後の過程は、AChR のエンドサイトーシ

Table 1. Electrophysiologic and immunologic studies in EAMG rats and in those with various modifications.

	1	2	3	4	5	
	Control (adjuvant only)	acute EAMG	chronic EAMG	acute EAMG treated with anti-C ₃ factor (cobra venom)	chronic EAMG developed after suppression of acute EAMG by prostaglandin E ₁	chronic EAMG pre-treated with denatured AChR(226 μg; 4times, every 15days)
	n=120	n=80	n=80	n=20	n=80	n=40
MEPP amplitude(mV)	0.75±0.205	0.41±0.269	0.22±0.088	0.60±0.208	0.24±0.109	0.44±0.198
frequency (per second)	6.7±2.99	4.0±1.37	2.9±1.20	6.1±2.97	3.1±1.35	5.1±2.06
Resting membrane potential(mV)	75±5.7	78±3.9	77±4.5	75±3.6	77±4.1	76±4.0
EPP, quantum content at 1 Hz stimulation	280±64.7	263±69.0	245±83.6	—	266±110.1	—
Antibody to muscle AChR(10 ⁻⁸ moles/L.)	0—0.2	0.2—1.0	5—66	0—0.3	3—23	26—50
Delayed cutaneous reactivity to AChR (20 pmoles)(induration and erythema in diameter, mm.)	0	20—23	0	—	0	0
Sensitized lymphocytes (S. I.)	0.8—1.5	2.6—7.9	3.2—10.9	—	—	—

スによる内部への陥入から、小胞性ライソゾームでのプロテアーゼによる崩壊で終る¹⁶⁾。従って骨格筋培養系を用いて調べると、この過程はプロテアーゼ阻害剤で阻止される(図9)が、そのほかATP依存系、Ca²⁺-ホスホリパーゼ、Ca²⁺依存性中性プロテアーゼの修飾も受けるようである(図9)。一方、筋無力症抗体で促された崩壊に続く再合成過程は十分に作動しており¹⁷⁾、Ca²⁺はcyclic AMPと共同してこの合成に関与し¹⁸⁾、またAChR phosphorylationにも関わる¹⁹⁾。

3. 補体介在性細胞性反応(図1参照)

ヒト筋無力症、動物モデル両者の終板膜に抗体IgGとともに補体の付着を観察できる(図4D)ことによって傍証され、AChR減少ばかりでなく終板膜の形態変化(図4A, B)を示す本病病像を説明する機序で

ある。抗体による動物への疾患移送はC₃によって強調されること²⁰⁾、ラットEAMG(急性期)は抗C₃因子処理によりその発症が抑えられること²⁰⁾(表1-3)に加え、先天性C₃欠損マウスにも抗体による疾患移送が成立するので、マクロファージなどのC_{3b} receptorを介するimmune-phagocytosisが補体介在機序として一役を演じていると考えられる。ヒト筋無力症の場合は神経筋接合部の超微形態上phagocytosisの所見は見出されないし、ヒト類似のラットEAMG慢性期像は、既述⁹⁾の通り発症過程中急性期を免疫薬理学的に抑えても成立しうるものである(表1-4)。C₄欠損モルモットにモノクローナル抗体を投与しても発症をみないこと²⁰⁾、ヒト筋無力症筋運動終板膜にC₉付着を証明できることなどを考えれば、ヒトまたはヒトに近似の病態の動物モデルでの補体介在機序には、抗原抗体複合体による古典的経路活性化からC_{5b-9} dimerによる終板膜破壊がより重要な位置

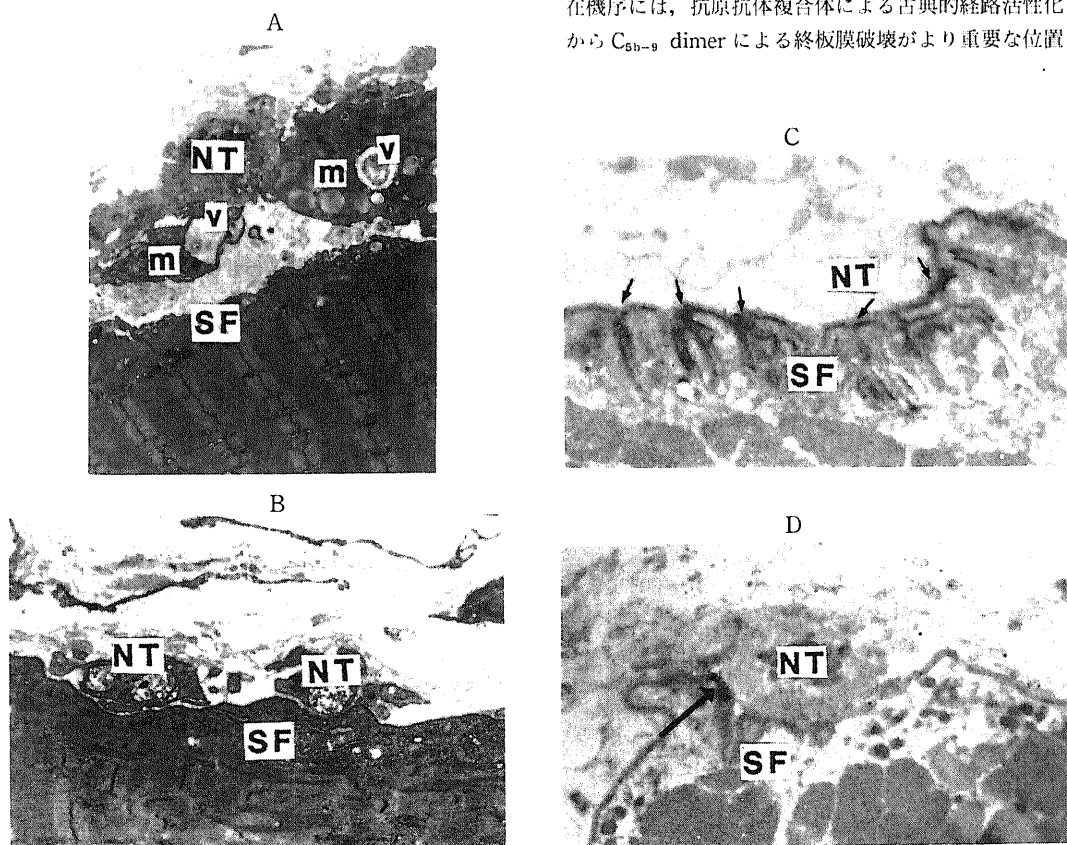
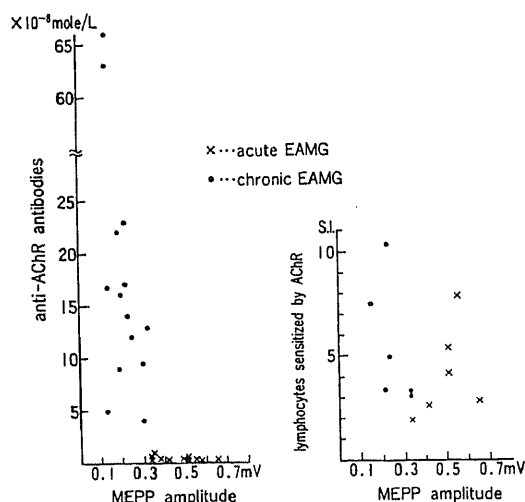


Fig. 4. Ultrastructural configuration of the endplates in experimental autoimmune myasthenia gravis (EAMG). A: acute EAMG; Nerve terminals (NT) and degenerating postsynaptic folds (SF) are separated by a space which contains macrophages (m) displaying phagocytic vacuoles (v). B: chronic EAMG; Two nerve terminals (NT) are applied against a highly simplified postsynaptic folds (SF). The left nerve terminal are surrounded by the Schwann cell. C: IgG localization at the endplate which shows degenerated change. D: C₃ localization at the endplate in which junctional folds are markedly degenerated.



を占められると思われる。

なお、この補体介在機序で実験動物に病態を誘導できるモノクローナル抗体²⁰⁾は、前項の受容体崩壊促進の機序に関わる抗体同様、既述した AChR α サブユニットの非 ACh 結合部 MIR、(図 3 参照)を標的とするものである²¹⁾。

4. 神経終末アセチルコリン遊離機能の修飾

神経終末からの ACh 量子性遊離は、神経終末にも局在が推定される受容体を介して、ACh 自体による

Fig.5. Relation of the disease severity expressed by the lowered miniature endplate potential (MEPP) amplitudes with anti-AChR antibody titers (left) and the stimulation indexes (lymphocytes sensitized with AChR, expressed by ³H-TDR uptake (right)).

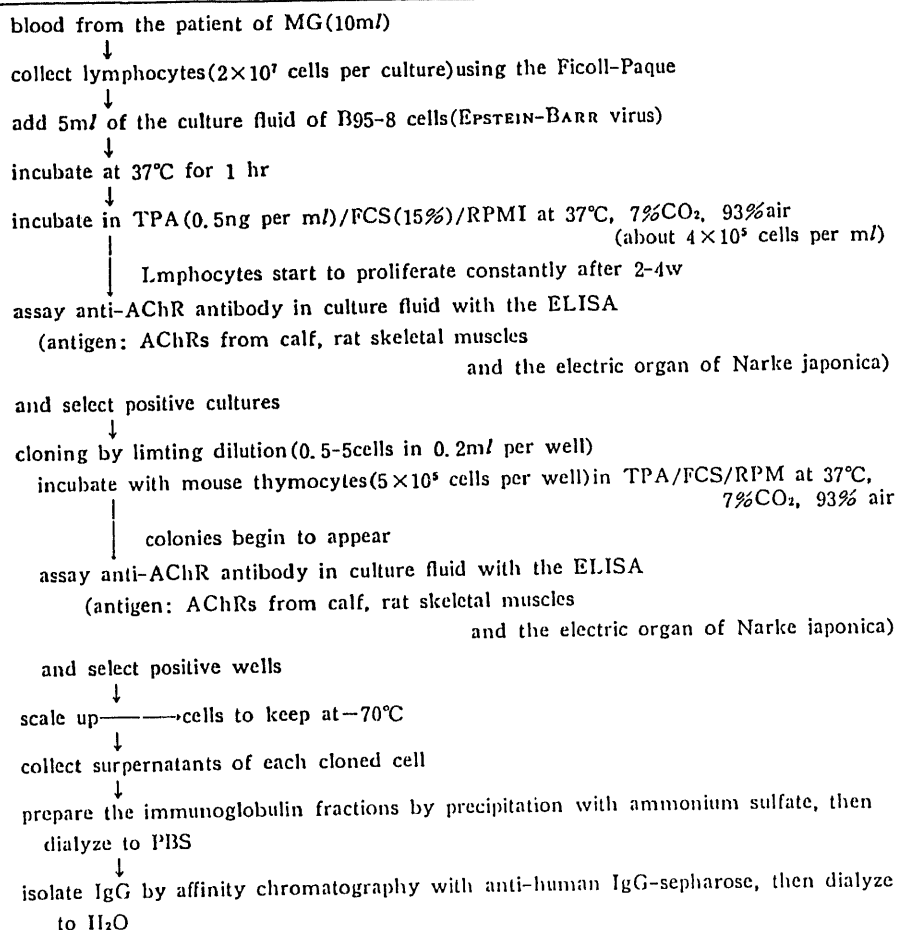


Fig.6. Method to obtain the cell line producing monoclonal antibody to AChR, established by cloned B cells from a patient with myasthenia gravis and by transforming them in vitro with the injection of Epstein-Barr virus.

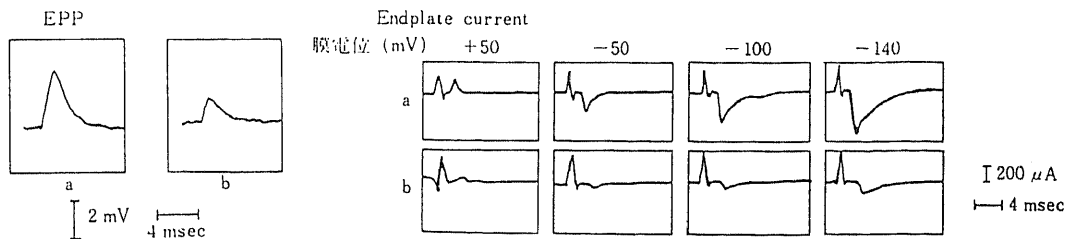


Fig. 7. Electrophysiologic indexes recorded from the neuromuscular junction (upper, rat diaphragm muscle; lower, frog sartorius muscle): Endplate potential (EPP) and endplate currents recorded under voltage clamp. a, recorded during the infusion of Ringer solution. b, recorded during the exposure to anti-AChR antibody IgG obtained from EAMG. Amplitudes of EPP and endplate currents were decreased by the exposure to myasthenic IgG, while relationship between the half-decay time of endplate current and the membrane potential under control condition was not altered when exposed to myasthenic IgG.

	Human myeloma IgG	Monoclonal anti-AChR IgG
a Immunological properties		
α -bungarotoxin binding to AChR (%)	0	52
Precipitation of α -bungarotoxin-labeled AChR with anti-IgG (pmoles/mg)	0	5
AChR degradation rate (half-life time, hrs.)	14	13.4
b Transfer to rat (intravenous injection of 5 mg)		
MEPP amplitude (mV)	0.70 ± 0.136	0.28 ± 0.143
	p < 0.001	
MEPP frequency (per second)	5.2 ± 2.08	3.6 ± 1.11
Resting membrane potential (mV)	75 ± 3.8	75 ± 6.3
	(n = 30)	(n = 30)
c Neuromuscular junction ultrastructure (Phrenic-diaphragm)		
	(human myeloma IgG)	(monoclonal anti-AChR IgG)

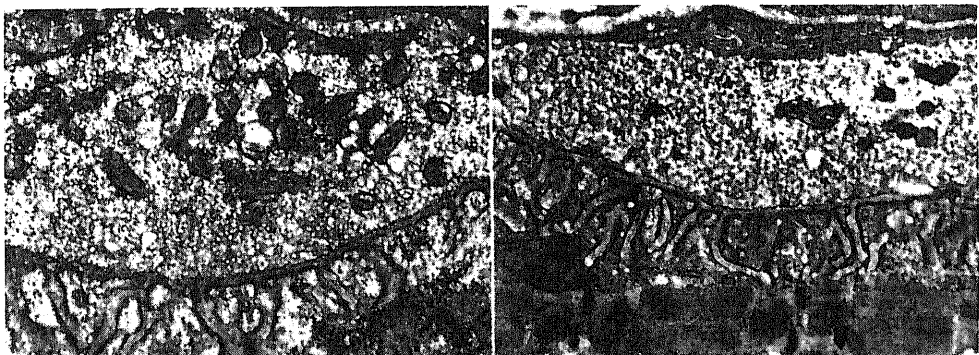


Fig. 8. a, Analyses of monoclonal anti-AChR antibody by three assay methods. b, Microelectrode study on the phrenic-diaphragm obtained from rat sacrificed on 2 days after the injection of monoclonal antibody. c, Neuromuscular junction ultrastructure of the rat studied on b.

autoregulationを受けている。事実、ラット横隔膜神経筋標本に voltage clamp をかけ、終板電位 EPP が記録できる実験条件下で、これを d-tubocurarine で灌流するとその ACh 結合部ブロックの結果、ACh 量子性遊離が増加する一方、イオン・チャンネル・ブロッカーである procaine 処理ではこの効果はみとめられない(表 2)²²⁾。もし、筋無力症抗体の一部が神経終末 AChR を標的として d-tubocurarine 同様の働きを演じれば、上述の autoregulation 機構は乱れることとなる。上述同様の処置を施した神経筋標本を、種々の抗体活性をもつヒト筋無力症血清で灌流した結果を図 11 に示している。ACh 量子性遊離量はトキシン・受容体結合阻止率で表現する blocking 抗体(図 3 および III-1 参

照) 活性値に相関し、他の 2 指標とは不相關であった⁹⁾。既述の EB ウイル感染法で樹立した細胞株産生モノクローナル抗体(III-1 参照; トキシン・受容体結合阻止率が高く ACh (BuTX) 結合部を標的とする特異抗体と評価したもの)で、上述同様の神経筋標本を灌流した場合も、d-tubocurarine の場合に近い ACh 量子性遊離量増加をみとめ、その前シナプス機能修飾作用を証明することができた(表 2)⁹⁾。従って、AChR α サブユニット ACh 結合部を標的とする抗体は、後シナプス性には受容体活性直接阻害(III-1 参照)にかかわる一方、前シナプス性には ACh 遊離制御からの開放を誘起するかたちで伝達効果を促す(後シナプス性ブロックを補償する)機序にかかわっていることが

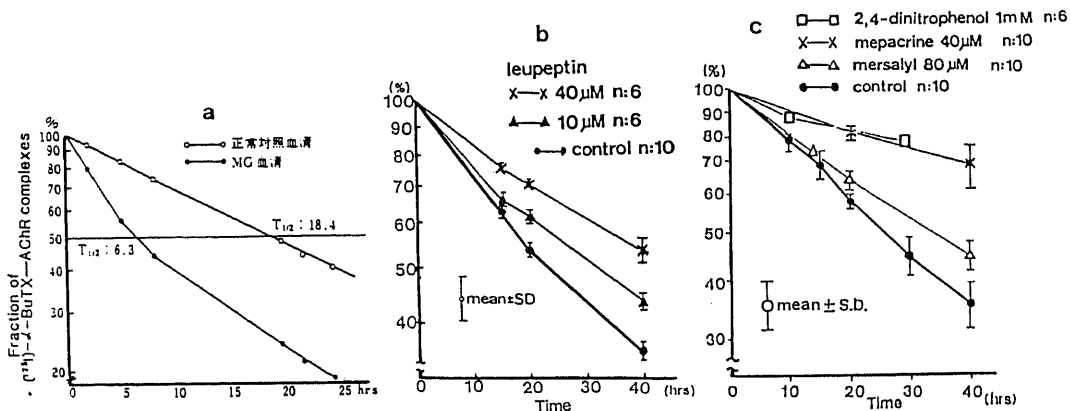


Fig. 9. AChR degradation measured by a method that utilizes the specific labeling of cultured myotube AChR with ^{125}I - α -bungarotoxin, the release of radioactive material derived from degraded AChR into the cultured medium, and the radioactivity of the remaining cell-bound complexes. The rate of degradation was calculated as the percentage of radioactivity released into the medium for a certain time divided by the total radioactivity. a, AChR degradation modified by myasthenic serum applied into the cultured medium. b and c, AChR degradation modified by pharmacologic agents given to the cultured medium.

Table 2. Presynaptic effect of pharmacologic agents and monoclonal antibody

	EPP amplitude(mV)	ACh quantum content of EPP during 1 Hz repetitive stimulation
Control(Ringer solution) (n : 40)	8.5 \pm 1.6	64 \pm 16
d-tubocurarine chloride (0.14 μM) (n : 40)	3.6 \pm 0.5	105 \pm 36
Procaine HCl($2\times 10^{-4}\text{M}$) (n : 15)	3.5 \pm 1.9	61 \pm 14
Monoclonal antibody directing against ACh-binding site* (IgG, 0.8 mg/ml) (n : 23)	4.0 \pm 1.5	90 \pm 24

(Mean \pm S.D.) values are indicated. n denotes number of endplates tested.

*Monoclonal antibody assay refers to Fig. 8.

示唆される。すなわち、autoreceptor の概念を導入すれば、シナプス病としての重症筋無力症の病態解明には、筋肉側受容体ばかりでなく、神経終末機能が如何ように免疫反応の修飾を受けているかを評価することも重要であろう。

IV. 抗イディオタイプ抗体と動物モデル

免疫グロブリンの可変領域を抗原決定基として產生される抗イディオタイプ抗体は自己抗体にも存在し、ヒト筋無力症では患者の約40%に抗AChRモノクローナル抗体に特異な抗イディオタイプ抗体が存在し、そのレベルは抗AChR抗体価の低い症例に高く、検出率には特定のHLA抗原との相関が論じられてい

る²³⁾。動物モデルを用いた idiotypic suppression には相反する報告がみられ、EAMG の実験的治療に抗イディオタイプ抗体は有効²⁴⁾あるいは無効²⁰⁾とされ、また抗Bis Q (AChR agonist) 抗体で免疫した動物には、抗イディオタイプ反応がみられ筋無力症類似の病態が作出できるという²⁵⁾。抗イディオタイプ抗体のアイソタイプの相異、量的相異による抑制・増強の相反

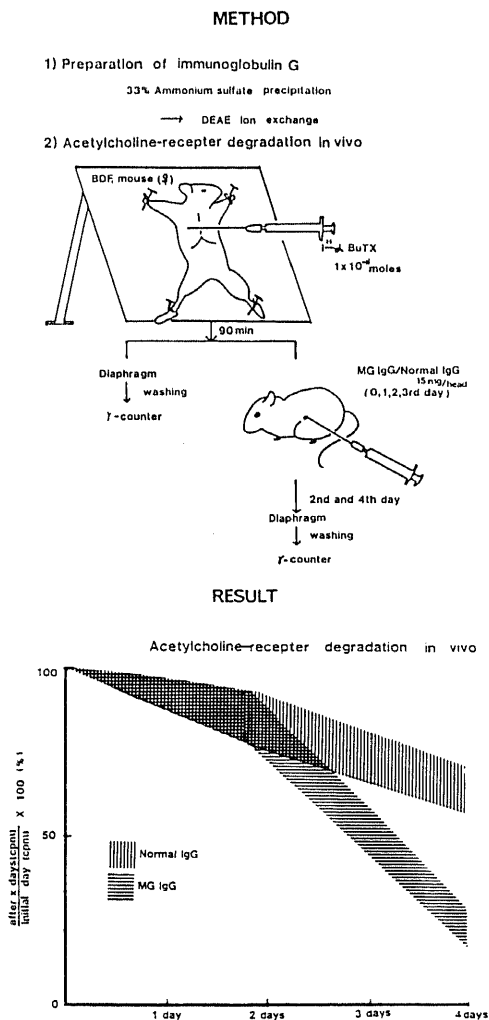


Fig. 10. In vivo study on the degradation of mouse diaphragm muscle AChR after the injection of myasthenic serum into the thorax.

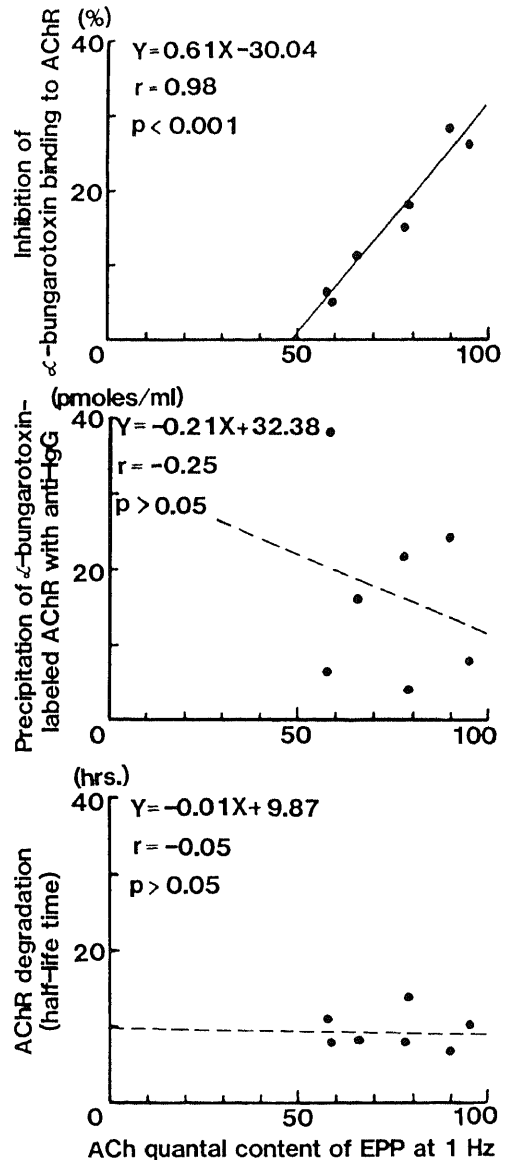


Fig. 11. Relationship between three immunologic indexes and ACh quantal content of EPPs which were elicited at 1 Hz and recorded under voltage-clamp preparation bathed with respective myasthenic serum.

する反応, イディオタイプがIgG分子個有か複数分子に共通か, などによって上述の一定しない動物実験成績がもたらされるのであろう。ヒト筋無力症治療への適用は容易ではない。

V. 抗原-合成ペプチドと動物モデル

cDNAの塩基配列から明らかにされたAChR各サブユニット蛋白の前駆体一次構造¹³⁾, それらの膜外・貫通・内配列推定 topography²⁶⁾ (図12上)は, 多様な筋無力症抗体解析の一環として, 残基配列のどの領域が膜表面側にあって病的抗原定基としての意味をもつかの研究に, 有益な情報を提供する。およその推定は親・疎水性 (図12下) によって立てられるが, 病原性特定のためには諸領域のペプチドを合成し, その免

疫薬理学的意義を明らかにしていかなければならない。 α サブユニットのACh結合部 (Val 46~Asp 180間のいずれか²⁷⁾) として注目されているのは, S-S架橋を形成するCys 128と142を含む領域, およびCys 192と193を含む領域である^{28)~30)}。われわれは, ヒトAChR残基番号に照合してLys 125~Gly 147, およびTry 184~Asp 200の2種のペプチド (図12上参照) を合成, これを抗原とした免疫動物実験を試みた。図13は前者の合成ペプチドによる免疫実験の結果を示している。抗ペプチド, 抗ラットAChR両抗体産生とともに, 電気生理学的 (微小電極法によるMEPP振幅を指標) に筋無力症の発症を確認した。しかし, この領域の抗体にはACh結合阻止作用は見出されず, ACh結合部ペプチドではないことは確かである。既述

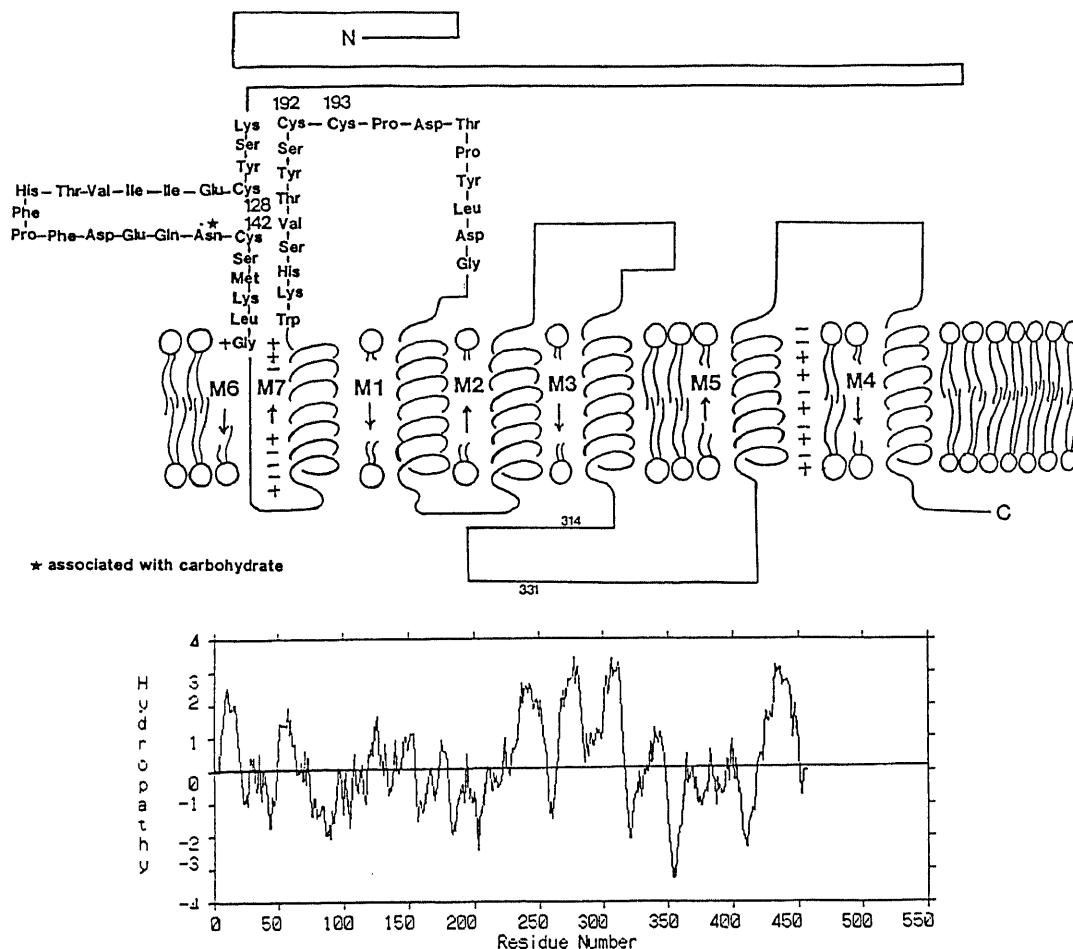


Fig.12. Upper-Model of polypeptide chain organization in AChR subunit. Seven hydrophobic transmembrane domain model proposed by Criado et al²⁶⁾. Sequence is for human α -subunit³⁾. Lower-Hydropathy for human α -subunit.

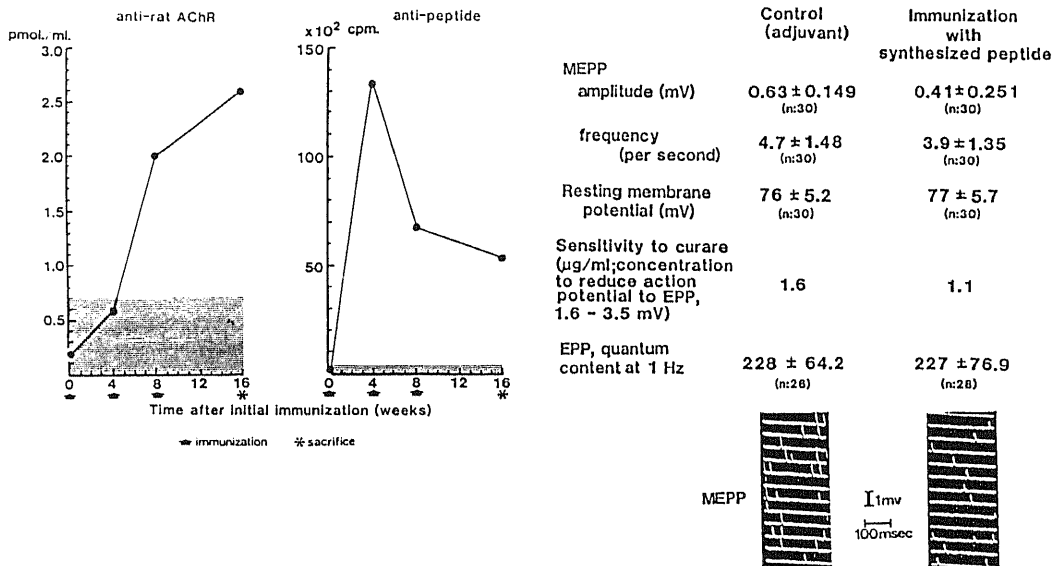


Fig. 13. Antibody assay in the course of development of the disease (left) and electrophysiological analysis at sacrifice 16 weeks after the first inoculation (right) in the rat immunized with synthetic peptide (human α -subunit Lys 125-Gly 147). Not only anti-peptide but also anti-rat AChR were increased along with additional immunization. At sacrifice, the induction of myasthenia was proved by lowered MEPP amplitude and supersensitivity to curare.

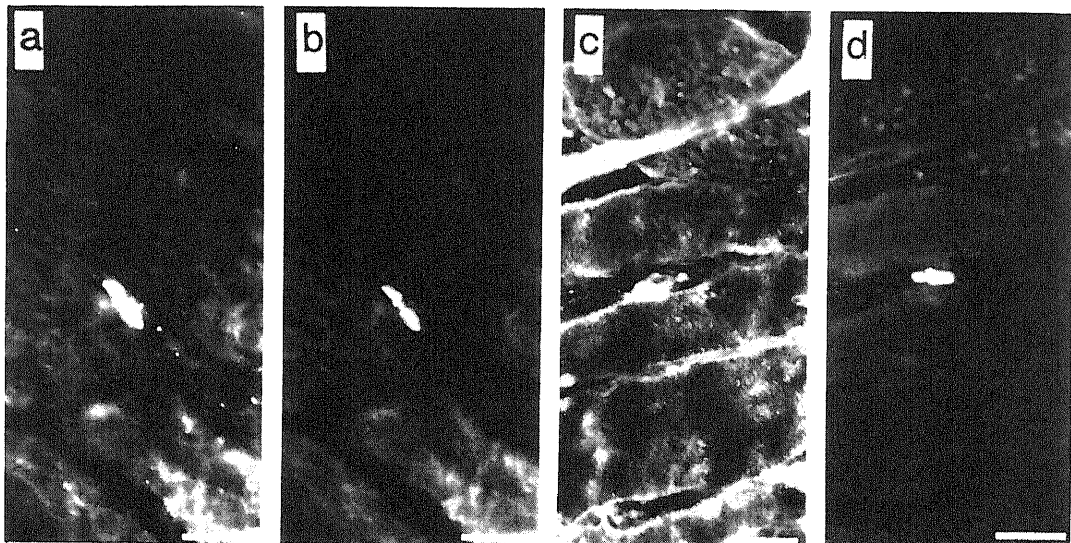


Fig. 14. Immunohistochemistry of cytoskeletal proteins (vinculin and filamin). Rat diaphragm muscles were incubated with antivinculin antibody (a), anti-filamin antibody (c), and tetramethylrhodamine-conjugated α -bungarotoxin (BuTX) (b and d). Sections were mounted and viewed with fluorescence optics selective for either fluorescein (a and c) or rhodamine (b and d). Synaptic sites marked by α -BuTX are reactive with anti-vinculin antibody (a and b); anti-filamin reactive site surrounds the α -BuTX-reactive site (c and d).

して来た本病成因に深いかかわりをもつ MIR 相応の領域であるのかも現在のところ不明である。しかし、この種の研究は、患者血中から特定領域を認識し特定作用を担うモノクローナル抗体を選別するとともに、受容体機能と構造の対応解析の方向へ、大きな展望を開く可能性を秘めているといえよう。

VI. 受容体周辺機構（細胞骨格）

AChR の膜への組み込み、クラスター形成に関与する可能性のある細胞骨格蛋白には、アクチン、43 kDa ペプチド、54 kDa ペプチド、ピンクリン、フィラミン、 α -アクチニンなどが挙げられる^{31)~33)}。図 14 は、AChR と近接して局在するピンクリン、フィラミンを免疫組織化学的に証明したものである。シナプス病である重症筋無力症病態解析には、受容膜効果を間接的に左右する可能性のあるこれら周辺機構も考慮に入れるべきであろう。事実、本病血清による培養細胞の AChR クラスター消失は、抗 AChR 抗体による受容体崩壊促進 (III-2 参照) に先行する現象とされている³⁴⁾。

VII. 抗体産生の免疫学的背景と動物モデル

T 細胞完全除去ラットを AChR で免疫しても抗体産生、疾患モデル成立がみられないこと、動物モデル EAMG の AChR 感作リンパ球の大半がヘルパー T 細胞であること、ヒトで特異的に AChR で感作された T 細胞はヘルパーの機能を担っていること、動物モデルの血中抗体価、重症度はその *in vitro* でのヘルパー T 細胞の AChR に対する反応および抗体産生とよく相関すること、などヒト、動物に共通した T 細胞のヘルパーとしての病因関与を示唆する諸成績がある³⁵⁾。また、患者リンパ球による抗 AChR 抗体産生は、AChR で刺激された正常ヒト由来 T 細胞で抑えられるが、患者由来のそれでは抑えられないことから、本病患者ではサプレッサー T 細胞の機能不全が示唆されており³⁶⁾、動物実験では AChR 特異的サプレッサー因子でマウスを前処置することによって EAMG が治療できるとの報告がある³⁷⁾。

特異抗原刺激に対する特異抗体産生は遺伝的にも支配されており、EAMG でもマウスを用いて免疫遺伝学的研究が行われている。ヘルパー T 細胞誘導には抗原提示細胞表面の免疫応答遺伝に関与する主要組織適合性複合体 (MHC) class II 抗原の認識が必要で、マウスでは H-2 抗原系の I-A 抗原がこれに当り、対応する I-A 遺伝子産物に対するモノクローナル抗体によって、マウス EAMG の実験的治療に成功している³⁸⁾。ヒトの場合は HLA 抗原系が問題となるが、今のところマウスの場合ほど直接的関与がある可能性は少

いように思われる。

VIII. 結 語

天然から得られる AChR を抗原とした動物モデルの作出から着手した重症筋無力症の研究につき、受容体と免疫の観点から、AChR 代謝、分子構造、周辺機構、モノクローナル抗体産生と作用機序解析、ペプチド合成とその抗原として活用、諸反応の背景にある免疫機構およびこれを支える免疫遺伝学的コントロールの概説を行い、神経難病の分子レベルからの研究の現況と展望を論じた。

本文に含むデータは厚生省免疫性神経疾患調査研究助成金、同神経疾患研究委託費、日本医師会、日本脳神経財団および東京生化学研究会助成金によって得られた。金沢大学医学部附属病院神経内科教室員一同の協力に深謝する。

本稿は昭和 61 年度十全同窓会総会講演「免疫、代謝、遺伝子解析からみた神経筋疾患」の一部「免疫とシナプス」の項にもとづいた。

文 献

- 1) Noda, M., Takahashi, H., Tanabe, T., Toyosato, M., Kiyotani, S., Furutani, Y., Takashima, H., Inayama, S., Miyata, T. & Numa, S.: Structural homology of Torpedo californica acetylcholine receptor subunits. *Nature*, **302**, 528-532 (1983).
- 2) Gu, Y., Silberstein, L. & Hall, Z. W.: The effect of a myasthenic serum on the acetylcholine receptors of C₂ myotubes. I. Immunological distribution between the two toxin-binding sites of the receptor. *J. Neurosci.*, **5**, 1909-1916 (1985).
- 3) Noda, M., Furutani, Y., Takahashi, H., Toyosato, M., Tanabe, T., Shimizu, S., Kikuyotani, S., Kayano, T., Hirose, T., Inayama, S. & Numa, S.: Cloning and sequence analysis of calf cDNA and human genomic DNA encoding α -subunit precursor of muscle acetylcholine receptor. *Nature*, **305**, 818-823 (1983).
- 4) Lindstrom, J.: Monoclonal antibodies as tools for studying acetylcholine receptors and myasthenia gravis. In P. Behan & F. Spreafico (eds), *Neuroimmunology*, p.47-55, Raven Press, New York, 1984.
- 5) Sakmann, B., Methfessel, C., Mishima, M., Takahashi, T., Takai, T., Kurasaki, M., Fukuda, K. & Numan, S.: Role of acetylcholine receptor

- subunits in gating of the channel. *Nature*, **318**, 538-543 (1985).
- 6) Takamori, M. & Ide, Y.: Effects of prostaglandin E_1 in experimental autoimmune myasthenia gravis. *Neurology (NY)*, **32**, 410-413 (1983).
- 7) Weinberg, C. B. & Hall, Z. W.: Antibodies from patients with myasthenia gravis recognize determinants unique to extrajunctional acetylcholine receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **76**, 504-508 (1979).
- 8) Gomez, C. M. & Richman, D. P.: Anti-acetylcholine receptor antibodies directed against the α -bungarotoxin binding site induce a unique form of experimental myasthenia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **80**, 4089-4093 (1983).
- 9) Takamori, M., Okumura, S. Yasuda, A.: Presynaptic modification of neuromuscular transmission by antiacetylcholine receptor antibody: Myasthenic serum and monoclonal antibody produced by transformed lymphocytes. *Neurology (Cleveland)*, **36**, 942-947 (1986).
- 10) Cull-Candy, S. G., Miledi, R. & Trautmann, A.: Endplate currents and acetylcholine noise at normal and myasthenic human endplates. *J. Physiol. (Lond)*, **287**, 247-265 (1979).
- 11) Aléma, S., Cull-Candy, S. G., Miledi, R. & Trautmann, A.: Properties of end-plate channels in rats immunized against acetylcholine receptors. *J. Physiol. (Lond)*, **311**, 251-266 (1981).
- 12) Takamori, M., Mori, M. & Kasai, M.: Experimental autoimmune myasthenia gravis and cholinergic ionophore. An electrophysiologic study. *Neurology (NY)*, **29**, 945-950 (1979).
- 13) Souroujon, M. C., Mochly-Rosen, D., Gordon, A. S. & Fuchs, S.: Interaction of monoclonal antibodies to Torpedo acetylcholine receptor with the receptor of skeletal muscle. *Muscle & Nerve*, **6**, 303-311 (1983).
- 14) Heineman, S., Bevan, S., Kugelberg, R., Lindstrom, J. & Rice, J.: Modulation of acetylcholine receptor by antibody against the receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **74**, 3090-3094 (1977).
- 15) Tzartos, S. J., Sophianos, D. & Efthimiadis, A.: Role of the main immunogenic region of acetylcholine receptor in myasthenia gravis. An Fab monoclonal antibody protects against antigenic modulation by human sera. *J. Immunol.*, **134**, 2342-2349 (1985).
- 16) Hyman, C. & Foehner, S. C.: Degradation of acetylcholine receptors in muscle cells: Effects of leupeptin on turnover rate, intracellular pool sizes, and receptor properties. *J. Cell Biol.*, **96**, 1316-1324 (1983).
- 17) Wilson, S., Vincent, A. & Newsom-Davis, J.: Acetylcholine receptor turnover in mice with passively transferred myasthenia gravis. II. Receptor synthesis. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, **46**, 383-387 (1983).
- 18) McManaman, J. L., Blosser, J. C. & Appel, S. H.: The effect of calcium on acetylcholine receptor synthesis. *J. Neurosci.*, **1**, 771-776 (1981).
- 19) Zavoics, G., Comerici, C., Subers, E., Egan, J. J., Huang, C-K, Feinstein, M. B. & Smilowitz, H.: cAMP, not Ca^{2+} /calmodulin, regulates the phosphorylation of acetylcholine receptor in Torpedo californica electroplax. *Biochem. Biophys. Acta*, **770**, 225-229 (1984).
- 20) Lennon, V. A. & Lambert, E. H.: Monoclonal autoantibodies to acetylcholine receptors: Evidence for a dominant idotype and requirement of complement for pathogenicity. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **377**, 77-95 (1981).
- 21) Lindstrom, J.: Immunobiology of myasthenia gravis, experimental autoimmune myasthenia gravis, and Lambert Eaton syndrome. *Ann. Rev. Immunol.*, **3**, 109-131 (1985).
- 22) Takamori, M., Sakato, S. & Okumura, S.: Presynaptic function modified by acetylcholine-receptor interaction in experimental autoimmune myasthenia gravis. *J. Neurol. Sci.*, **66**, 245-253 (1984).
- 23) Lefvert, A. K., Priskanan, R. & Svanborg, E.: Antiidiotypic antibodies, acetylcholine receptor antibodies and disturbed neuromuscular function in healthy relatives to patients with myasthenia gravis. *J. Neuroimmunol.*, **9**, 41-53 (198).
- 24) Souroujon, M. C., Pachner, A. R. & Fuchs, S.: The treatment of passively transferred experimental myasthenia with anti-idiotypic antibodies. *Neurology (Cleveland)*, **36**, 622-625 (1986).
- 25) Cleveland, W. L., Wassermann, N. H., Sarangarajan, R., Penn, A. J. & Erlanger, B. F.: Monoclonal antibodies to the acetylcholine receptor by a normally functioning auto-anti-idio-

typic mechanism. *Nature*, **305**, 56-57 (1983).

26) Criado, M., Mochschwender, S., Sarin, V., Fox, J. L. & Lindstrom, L.: Evidence for unpredicted transmembrane domains in acetylcholine receptor subunits. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **82**, 2004-2008 (1985).

27) Oblas, B., Singer, R. H. & Boyd, N. D.: Location of a polypeptide sequence within the α -subunit of the acetylcholine receptor containing the cholinergic binding site. *Mol. Pharmacol.*, **29**, 649-656 (1986).

28) Lennon, V. A., McCormick, D. J., Lambert, E. H., Griestmann, G. E. & Atassi, M. Z.: Region of peptide 125-147 of acetylcholine α subunit is exposed at neuromuscular junction and induces experimental autoimmune myasthenia gravis, T-cell immunity, and modulating autoantibodies. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **82**, 8805-8809 (1985).

29) Criado, M., Sarin, V., Fox, L. & Lindstrom, J.: Evidence that the acetylcholine binding site is not formed by the sequence α 127-143 of the acetylcholine receptor. *Biochem.*, **25**, 2839-2846 (1986).

30) Boulter, J., Luyten, W., Evans, K., Mason, P., Ballivet, M., Goldman, D., Steingelin, S., Martin, G., Heinemann, S. & Patrick, J.: Isolation of a clone coding for the α -subunit of a mouse acetylcholine receptor. *J. Neurosci.*, **5**, 2545-2552 (1985).

31) Bloch, R. J. & Hall, Z. W.: Cytoskeletal components of the vertebrate neuromuscular junction: Vinculin, α -actinin, and filamin. *J. Cell Biol.*, **97**, 217-223 (1983).

32) Burden, S. J.: The subsynaptic 43-kDa protein is concentrated at developing nerve-muscle synapses in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **82**, 8270-8273 (1985).

33) Walker, J. H., Boustead, C. M. & Witzemann, V.: Cytoskeletal proteins at the cholinergic synapses: Distribution of desmin, actin, fordin, neurofilaments, and tubulin in Torpedo electric organ. *Eur. J. Cell Biol.*, **38**, 123-133 (1985).

34) Burstajn, S., McManaman, J. L., Elias, S. B. & Appel, S. H.: Myasthenic globulin enhances the loss of acetylcholine receptor clusters. *Science*, **219**, 195-197 (1983).

35) 高守正治: 筋無力症の発症機序をめぐって. *Annual Review 神経* 1986 (後藤文男, 萬年 徹, 高倉公明, 木下眞男, 井原康夫編), 258-268 頁, 中外医学社, 東京, 1986.

36) Shinomiya, N., Yata, J. & Sasaki, T.: T-cell subsets regulating anti-acetylcholine receptor antibody formation in myasthenia gravis and characterization of suppressor T-cell factors involved. *Clin. Immunol. Immunopath.*, **33**, 182-190 (1984).

37) Bogue, S., Mozes, E. & Fuchs, S.: Induction of acetylcholine receptor-specific suppression. An in vivo model of antigen-specific immunosuppression in myasthenia gravis. *J. Exp. Med.*, **159**, 292-304 (1984).

38) Wadler, M. K., Sriram, S., McDevitt, H. C. & Steinman, L.: In vitro therapy with monoclonal anti-I-A antibody suppresses immune responses to acetylcholine receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **80**, 2713-2717 (1983).